

(10)

XP-002264091

AN - 1997-415327 [38]  
AP - WO1997JP00300 19970207 AU19970016189 19970207; [Based on WO9729166 ]  
JP19970528379 19970207; WO1997JP00300 19970207; [Based on WO9729166 ]  
CPY - SANG-N  
CT - JP3217484; JP3273098; JP436214  
DC - B04 D13 D16 D21 D22  
DS - AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE  
DR - 0009-S 0245-S 0247-S 0419-S 0900-S 1060-S 1327-S 1656-S  
FS - CPI  
IC - A23L1/30 ; A23L3/3472 ; A61K7/00 ; A61K7/16 ; A61K35/32 ; A61K35/78 ;  
C09K15/34  
IN - ABE M; KARAHASHI Y; TAIRA T; WATANABE T  
MC - B04-B04E B14-S08 D03-H01P D05-A02 D08-A D08-B D09-C01D  
M1 - [01] M423 M710 M720 M903 N134 N161 N421 N513 N520 P911 Q220 Q254 Q624  
V600 V644  
PA - (SANG-N) SANGI CO LTD  
PN - WO9729166 A1 19970814 DW199738 C09K15/34 Jpn 054pp  
- AU1618997 A 19970828 DW199750 C09K15/34 000pp  
- JP9528379T T 19990326 DW199923 C09K15/34 000pp  
PR - JP19960046744 19960207  
XA - C1997-133023  
XIC - A23L-001/30 ; A23L-003/3472 ; A61K-007/00 ; A61K-007/16 ; A61K-035/32 ;  
A61K-035/78 ; C09K-015/34  
AB - WO9729166 Antioxidant, obtained by dissolving hard tissues, contains a  
fraction which has at least 1 of peroxidation suppressing, active  
oxygen scavenging and free radical scavenging functions. Also claimed  
is a method for the preparation of the antioxidant.  
- USE - The antioxidant can be used in foods, medicines, cosmetics, bone  
packing agents for medical use, tooth paste ingredients, pellets for  
use inside the body and animal feed (claimed).  
- ADVANTAGE - The antioxidant has good preservability, heat stability  
and no safety problems from carcinogenicity. The preparation process  
is efficient.  
- (Dwg.0/14)  
DN - AU BR CA CN FI JP KR MX NO NZ RU SG US VN  
IW - ANTIOXIDANT OBTAIN DISSOLVE HARD TISSUE USEFUL FOOD MEDICINE COSMETIC  
BONE PACK AGENT MEDICAL TOOTH PASTE INGREDIENT  
IKW - ANTIOXIDANT OBTAIN DISSOLVE HARD TISSUE USEFUL FOOD MEDICINE COSMETIC  
BONE PACK AGENT MEDICAL TOOTH PASTE INGREDIENT  
INW - ABE M; KARAHASHI Y; TAIRA T; WATANABE T  
NC - 030  
OPD - 1996-02-07  
ORD - 1997-08-14  
PAW - (SANG-N) SANGI CO LTD  
TI - Antioxidant obtained by dissolving hard tissues - useful in food,  
medicine, cosmetics, bone packing agent for medical use and tooth  
paste ingredients

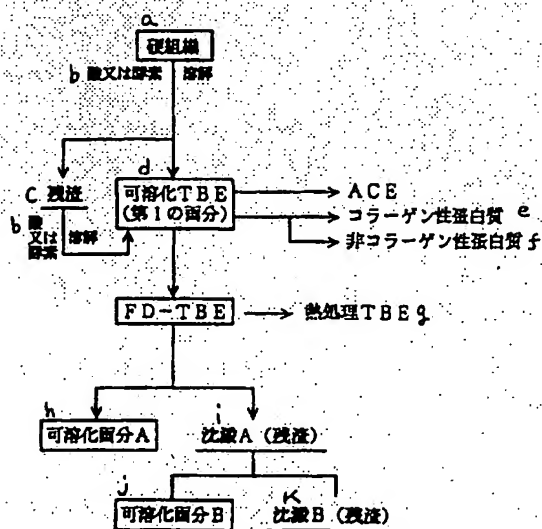


10

<b>(51) 国際特許分類</b> <b>C09K 15/34, A23L 1/30, 3/3472, A61K 7/00, 7/16, 35/32, 35/78</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/29166</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1997年8月14日(14.08.97)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> <b>PCT/JP97/00300</b>  <b>(22) 国際出願日</b> <b>1997年2月7日(07.02.97)</b>  <b>(30) 優先権データ</b> <b>特願平8/46744 1996年2月7日(07.02.96) JP</b>  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> <b>株式会社 サンギ(SANGI CO., LTD.)(JP/JP)</b> <b>〒104 東京都中央区築地3丁目11番6号 Tokyo, (JP)</b> <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> <b>渡邊隆之(WATANABE, Takayuki)(JP/JP)</b> <b>唐橋良恵(KARAHASHI, Yoshie)(JP/JP)</b> <b>阿部 真(ABE, Makoto)(JP/JP)</b> <b>平 敏夫(TAIRA, Toshio)(JP/JP)</b> <b>〒064 北海道札幌市中央区南10条西6丁目4番11号</b> <b>株式会社 サンギ 札幌研究所内 Hokkaido, (JP)</b> <b>(74) 代理人</b> <b>弁理士 逢坂 宏(OSAKA, Hiromu)</b> <b>〒190 東京都立川市柴崎町2丁目4番11号</b> <b>ファインビル Tokyo, (JP)</b>	<b>(81) 指定国</b> AU, BR, CA, CN, FI, JP, KR, MX, NO, NZ, RU, SG, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>添付公開書類</b> <b>国際調査報告書</b>	

(54)Title: ANTIOXIDANT AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54)発明の名称 抗酸化剤及びその製造方法



- a ... Hard tissue
- b ... Acidic or enzymatic dissolution
- c ... Residue
- d ... Solubilized TBE (first fraction)
- e ... Collagen protein
- f ... Non-collagen protein
- g ... Heat-treated TBE
- h ... Solubilized fraction A
- i ... Precipitate A (residue)
- j ... Solubilized fraction B
- k ... Precipitate B (residue)

## (57) Abstract

An antioxidant containing a fraction, particularly a calcium apatite extract or a collagen protein, that is obtainable by dissolving hard tissues, such as bovine bones, with acids or enzymes and has at least one function selected among peroxidation inhibiting, active oxygen scavenging and free radical scavenging; and a process for producing the antioxidant having the above function(s) by dissolving the above hard tissues. The antioxidant has not only the above function(s) but also safety, such as freedom from carcinogenicity, and is excellent in thermal storability and stability, while the process is featured by efficiency.

(57) 要約

例えば牛骨等の硬組織を酸や酵素等で溶解して得られる物質であって、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた少なくとも1種の機能を備えた画分（特にアパタイトカルシウムエキスやコラーゲン性蛋白質）を含む抗酸化剤。同硬組織を溶解させて過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能を備えた前記画分を得る、抗酸化剤の製造方法。

過酸化抑制能、活性酸素消去能及びフリーラジカルの消去能等の活性を有し、発癌性が無い等の安全性、かつ、熱的保存性や安定性に優れた抗酸化剤、及びその効率的な製造方法を提供すること。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バハマ	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	HN	ホンデュラス	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MK	マケドニア	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IT	イタリア	ML	マリ	TG	トーゴ
CC	中東	JP	日本	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	KE	ケニア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CG	コンゴ	KG	キルギスタン	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KZ	カザフスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボワール	LA	ラオス	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	LV	リトアニア	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	LT	リトアニア	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CO	コロンビア	LU	ルクセンブルグ	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	LV	ラトヴィア	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
DK	デンマーク	LA	ラオス	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 抗酸化剤及びその製造方法

産業上の利用分野

- 5       本発明は、硬組織（例えば、動物の骨や歯）を原料とする抗酸化剤、及びその製造方法に関するものである。

従来技術

- 10       従来より、合成抗酸化物質として使用されているものとして、ブチルヒドロキシアニトール（以下、BHAと称する。）やブチルヒドロキシトルエン（以下、BHTと称する。）がある。しかし、BHAは抗酸化剤としての活性が劣り、また大量に摂取すると発癌することがある。また、BHTは活性には優れているもののBHAと同様、その安全性に関し、発癌等の問題が指摘されている。

- 15       そこで、食品添加剤や薬剤に利用できる合成抗酸化剤や植物組織由来の抗酸化物質として、ビタミンCやトコフェロールが注目されており、安全な抗酸化剤として利用されている。また、安全性の高い動物組織由来の抗酸化物質としては、ビタミンE群のほか、酵素であるスーパーオキサイドディスムターゼ（以下、SODと称することがある。）がある。これは生体内部で発生する活性酸素（特に、スーパーオキサイド： $O_2^-$ ）及びフリーラジカル（特に、ヒドロキシラジカル： $\cdot OH$ ）等を消去する機能をもち、医薬品、化粧品等としての利用が期待されている。
- 20       ところで、天然系の、特に植物由来の抗酸化物質（例えば、トコフェロール等）は、それ自身の保存性に問題があったり、場合によっては、原料植物由来のフレーバーを除去する必要がある。また、溶解させる場合、水溶性或いは脂溶性といった性質から溶媒の選択に制限が生じて生

体内部で広く作用できないということがある。また、食品や医薬品として摂取する場合、組織や脂肪に対する生物利用性における効果に疑問が残るとされている。

5       また、前記動物組織由来の酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）や、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼ等は蛋白質であるので、熱変性を受け易く、また、生体内で異物として分解を受け易い等、活性の安定性を維持するのが困難であった。

#### 発明の目的

10       本発明の目的は、過酸化抑制能等の活性を有し、発癌性が無い等の安全性、また、保存性や熱的安定性等に優れた抗酸化剤、及びこの抗酸化剤を効率よく製造する製造方法を提供することにある。

#### 発明の構成

15       本発明者は、上述した課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、骨、軟骨、歯等の硬組織を溶解して得られる物質が、抗酸化剤として過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能等の活性を有し、また、安全性に問題が無く、かつ保存性や安定性等にも優れた性能を発揮することを見出した。

20       即ち、本発明は、硬組織を溶解して得られる物質であって、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの機能を備えた画分を含む抗酸化剤（以下、本発明の抗酸化剤と称する。）に係るものである。

      本発明の抗酸化剤によれば、硬組織を、例えば可食酸又は／及び果実から得られる酵素等で溶解して得られる物質であって、過酸化抑制機能、活性酸素（特に、 $O_2^-$ ）消去能及びフリーラジカル（特に、 $\cdot OH$ ）消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの機能を備えた画分を含ん

でいるので、前記機能の優れた活性を有し、また、発癌等の安全性に問題が無く、かつ保存性や熱的安定性等にも優れた抗酸化剤を提供することができる。

5 本発明に係る抗酸化剤は、硬組織を酸や酵素等により溶解して得られる物質のうち、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの機能を備えた画分（特に、2つ又は3つの前記機能を備えた画分）を含んで構成されており、こ  
10 でいう硬組織とは、動物（生物）又はその化石類の硬組織であって、哺乳類、鳥類及び魚類の骨、骨髄、軟骨、歯、貝殻、甲殻類外殻、卵殻又は珊瑚、貝化石や龍骨等の化石類等からなるものである。また、これらの構成成分は、その約70%がハイドロキシアパタイト等のミネラル複合体、約20%がコラーゲンを主体とする有機物、残りの約10%が水分である。

前記硬組織が備えるこれらの各成分を例えば酸や酵素で抽出した場合、  
15 特に、コラーゲンや非コラーゲン性蛋白質、ムコ多糖等を主体とする有機物群やハイドロキシアパタイト等のミネラル複合体が作用して、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの機能（特に、2つ又は3つの前記機能）が発揮されることが本発明者により確認された。

20 なお、上記過酸化抑制機能とは、一般に生体内における活性酸素（特に、 $O_2^-$ ）消去機能及びフリーラジカル（特に、 $\cdot OH$ ）消去機能を包含する概念として使用されるが、本明細書においてはその概念を明確にするため、過酸化抑制機能という場合は主として生体外における、例えば食品等の酸化防止機能を意味し、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能という場合は主として生体内における各種活性酸素消去能及びフ

リーラジカル消去能を意味する言葉として使用する。

このように、本発明の抗酸化剤によれば、合成抗酸化剤における発癌性の問題をもたず、活性に優れ、同時に天然系抗酸化剤における保存性、臭気、溶媒の制限、安定性等の問題を解決した抗酸化剤を提供できると考えられる。

また、本発明の抗酸化剤は、特に「 $O_2^-$ 」、「 $\cdot OH$ 」、「 $^1O_2$ 」などに対する優れた消去能を有するが、例えば、 $H_2O_2$ 、 $LOO\cdot$ （リピッドペロキシラジカル）、 $LO\cdot$ （リピッドアルコキシラジカル）等の活性酸素やフリーラジカルに対しても十分な抗酸化作用を示すと考えられる。

また、本発明は、硬組織を溶解させて、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの機能を備えた画分を含む抗酸化剤を得る、抗酸化剤の製造方法（以下、本発明の製造方法と称する。）に係るものである。

本発明の製造方法によれば、動物（生物）の硬組織を、例えば可食酸や果実から得られる酵素等で溶解させて、過酸化抑制機能、活性酸素（特に、 $O_2^-$ ）消去能及びフリーラジカル（特に、 $\cdot OH$ ）消去能などを備える画分を得るので、前記機能の活性に優れ、また、発癌等の安全性に問題が無く、かつ保存性や熱的安定性等にも優れた性能を発揮する抗酸化剤を効率よく製造することができる。

本発明の抗酸化剤によれば、前記画分が、生物硬組織と酸又は／及び酵素とを混合、溶解して得られたものとすることができる。

即ち、本発明においては、生物硬組織と酸又は／及び酵素とを混合する工程と、この混合物を溶解させる工程と、この溶解液から前記画分を得る工程とを有する製造方法とすることができる。



また、本発明の抗酸化剤及び本発明の製造方法において、前記生物硬組織が家畜骨からなることが好ましい。豚、鳥（特に鶏）、牛等の家畜の骨は入手容易かつ安価な材料として有用である。特に、牛骨は、産業廃棄物として多量に処分されており、コスト的に最も利用し易い。

5       ここで、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つ（好ましくは2つ又は3つ）の機能を備えた前記画分について図1を参照しながら説明する。

本発明の抗酸化剤は、上述したように、骨、軟骨、歯等の生物硬組織を、例えば可食酸又は果実から得られる酵素等で溶解して得られる物質  
10       である。

例えば、骨（例えば牛骨）と酸（又は／及び酵素）とを混合及び溶解して前記画分を得る場合、得られた骨成分溶解物（可溶化TBE：Total Bone Extract）を凍結及び乾燥処理を施して粉末状の画分（図1ではFD-TBE。）とすることができる。更に、このFD-TBE（凍結乾燥TBE：以下、同様）に加熱処理を施してもよい（熱処理TBE）。  
15       

また、本発明に基づく可溶化TBE（第1の画分）からは、前記FD-TBEや熱処理TBEの他にも抗酸化作用（即ち、過酸化抑制機能、活性酸素消去能、フリーラジカル消去能）を有する様々な画分を得ることができる。

20       例えば、詳しくは後述するが、可溶化TBE（第1の画分）からエタノール等の溶媒で抽出する可溶化画分Aやこの可溶化画分Aと同時に生成する沈殿Aから得られる可溶化画分B、更には、前記可溶化TBE（第1の画分）に含まれる（或いは可溶化TBEそのものである）アパタイトカルシウムエキス（ACE）、前記可溶化TBEから得られるコラーゲン性蛋白質、このコラーゲン性蛋白質と同時に生成する残渣から



得られる非コラーゲン性蛋白質などである。

ここで、上記の骨成分溶解物（可溶化TBE）やFD-TBE、アパタイトカルシウムエキス（ACE）などを溶液状のものとして使用することもできるが、粉末状のものとして使用することもできる。

5 次に、前記可溶化TBEから得られる様々な画分について説明する。

例えば、本発明の抗酸化剤において、前記画分（即ち、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能などの抗酸化作用を有する画分：以下、同様）を、前記生物硬組織と酸又は／及び酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分（可溶化TBE）を更に溶媒で抽出したものとすることができる。

即ち、本発明の製造方法において、前記生物硬組織と前記酸又は／及び前記酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分（可溶化TBE）を溶媒で抽出して前記画分（例えば、図1の可溶化画分A）を得ることができる。

15 例えば、図1に示すように、上述の方法によって得られた凍結乾燥TBEをエタノール溶液で抽出すると、可溶化画分Aと沈殿A（残渣）とに分けることができる。また、前述したTBEと同様に、この可溶化画分Aは液状、粉末状等任意の形態で 사용할 ことができる。

また、本発明の抗酸化剤において、前記画分が、前記生物硬組織と酸又は酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分（可溶化TBE）を溶媒で抽出した後の残渣（例えば、図1の沈殿A）を、更に水で抽出したものとすることができる。

20 即ち、本発明の製造方法において、前記生物硬組織と前記酸又は／及び前記酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分を溶媒で抽出した後の残渣（例えば、図1の沈殿A）を、更に水などで抽出して前記画分

(例えば、図1の可溶化画分B)を得ることが可能である。

図1に示すように、可溶化TBEを、例えば60%のエタノール溶液で抽出すると、可溶化画分Aと沈殿Aとに分けることができ、更に、この沈殿Aを残渣とし、これを水で抽出すると可溶化画分Bと沈殿Bとに分離することができる。

本発明においては、上述した可溶解画分Aと同様に、この可溶化画分Bを液状、粉末状等、任意の形態で 사용할 ことができる。詳しくは後述するが、この可溶化画分Bは前記凍結乾燥TBEと同程度又はそれ以上の過酸化抑制能や活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能などを発揮する。

ここで、前記溶媒としては、前記画分(特に可溶化TBE)の成分を変化させるものでなく、かつ安全性に高いものであって、更に前記画分を溶解できるものであれば様々な公知の溶媒を使用することができるが、これらの条件を満たす溶媒として特にエタノールが好ましい。

このように本発明において、前記画分とは硬組織を由来とする画分であって、その抽出方法、精製方法等にはよらず、様々な方法によって、目的とする種々の特性を有する画分を得ることが十分に可能である。

また、本発明の抗酸化剤及び本発明の製造方法においては、前記酸を可食性の酸とし、前記酵素を果実酵素とすることが好ましい。これらの可食性の酸や果実酵素以外にも用途によっては塩酸、炭酸などの酸を使用することも十分に可能である。

例えば、前記可食性の酸として、乳酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、アスコルビン酸、酒石酸、リン酸、フマル酸、グルコン酸及びアジピン酸からなる群より選ばれた少なくとも1種の酸を使用することができる。

また、例えば、前記酵素として、パイナップル、レモン、メロン、キウイフルーツ、マンゴー、パパイヤ、イチジク及びナシからなる群より選ばれた少なくとも1種の果実と、K I B I N N（果実酵素の商品名）と、ポリアーゼSM（果実酵素の商品名）とからなる群より選ばれた少なくとも1種を使用することもできる。

また、本発明の抗酸化剤及び本発明の製造方法においては、前記画分に少なくともコラーゲン性蛋白質又は非コラーゲン性蛋白質が含有されていることが好ましい。

このコラーゲン性蛋白質（T B Eより抽出されたペプチド、ゼラチンなどを含むコラーゲン性蛋白質）は、過酸化抑制作用に優れるものであり、コラーゲンそのものよりも優れた過酸化抑制機能を有している。このコラーゲン性蛋白質は、塩析法又は陽イオン交換カラムクロマトグラフィー法などにより前記画分から抽出することができる。

また、非コラーゲン性蛋白質は、前記コラーゲン性蛋白質を抽出する際に得られる残渣をゲル濾過などのカラムクロマトグラフィーを行って調製することにより得ることができる。この画分（非コラーゲン性蛋白質）も過酸化抑制機能等の抗酸化作用を有している。

また、本発明においては、前記可溶化T B EやF D - T B Eを透析などの手段によって更に精製してもよい。

また、本発明の抗酸化剤及び本発明の製造方法において、前記画分が粉末状であることが好ましい。このように、前記画分（即ち、抗酸化剤）が粉末状であると、取扱いに容易であることなどの利点がある。

更に、本発明の抗酸化剤及び本発明の製造方法において、前記画分が熱処理されたものとすることができる。

本発明に基づく画分は、熱によって分解しにくい（即ち、熱的に安定

である。)だけでなく、熱処理によって更に性能が向上することがある。

例えば、前記凍結乾燥TBEは熱処理すると、熱処理する前の凍結乾燥TBEに比べても幾分過酸化抑制能が向上することがある。

5 また、本発明の製造方法において、前記硬組織と前記酸又は／及び前記酵素との混合物を減圧下（例えば、真空下）で溶解させることができる。

特に、粒径5mm以下に粉碎した前記生物硬組織と前記酸又は／及び前記酵素とを混合し、減圧下において溶解することが好ましい。圧力を小さくするほど、即ち、脱気の程度が進むほど、骨ミネラル等の溶解処理速度が大きくなる。また、減圧に伴う成分変化は確認されていない。  
10 また、前記生物硬組織を粒径5mm以下に粉碎すると、更に、溶解時間を短くすることができる。

即ち、常圧で溶解を進行させる場合に比べてその収量も増加する。なお、健全な硬組織（特に天然骨）は、その分子量は数百～200万Da  
15 以上の広がりを持つが、このように、減圧下で溶解を進行させる場合、特に高分子領域（100万～200万Da）の骨成分を得ることができる。このような高分子領域には、生理活性に優れた蛋白質や多糖類等の有機物が含まれる。

20 前記硬組織は、哺乳類（特に牛）、鳥類又は魚類の骨を主とするが、それらの骨髄や歯、又は貝殻、甲殻類外殻、珊瑚等を使用することができる。より具体的には、例えば、牛骨、豚骨、鶏骨、羊骨、魚骨、歯、貝殻、珊瑚等である。上述したように、特に、牛骨は産業廃棄物として大量に処分されており、コスト的にも有利である。また、前記酸としては、可食酸、特に乳酸が好ましく、酢酸等の他の可食酸に比べて味が安定するという利点がある。

このようにして、前記生物硬組織と前記酸又は／及び前記酵素との混合物が可溶化された画分を得るには、硬組織を粉碎し、溶解剤として酸（特に可食性の酸）又は／及び酵素（特に果実酵素）と混合（浸漬、溶解、懸濁）し、減圧下で溶解するのがよい。

5       即ち、減圧状態、例えば真空状態で上記混合物（混合液）を攪拌したときには、硬組織粉末中の微小空隙内の空気が脱気され、酸性溶液（又は／及び酵素溶液）がその微小空隙に侵入する。この場合、減圧状態から大気圧に少なくとも1回（実際には複数回）戻すときは、減圧下にそのまま放置する場合よりも、気泡を十分になくすることができる。

10       この結果、硬組織粉末と溶解剤（即ち、酸又は／及び酵素の溶剤）との接触が十分となり、迅速かつ十分な溶解が達成できるため、硬組織粉末と溶液との接触が促進されて溶解処理時間が短縮され、溶解効率が向上する。

15       このような状態では、硬組織粉末は、その外周面及び内部微小空隙が共に前記溶液に確実に接触し、溶解作用を受けることになる。減圧により硬組織内部に侵入して接触する酸性溶液（又は／及び酵素溶液）の絶対量は、大気圧条件下に攪拌した場合における酸性溶液（又は／及び酵素溶液）の接触量の数十倍～数百倍に達する。

20       このため、溶解処理時間が飛躍的に短縮されると共に、重要な硬組織成分の十分な溶解が可能となる。これは、酸性溶液（又は／及び酵素溶液）が微小骨粉体に対し内部から接触し、硬組織から過酸化抑制機能、活性酸素消去能、フリーラジカル消去能などを備える画分が十分に抽出されるからである。

      また、溶解処理時間が短縮されることにより、酸性溶液（又は／及び酵素溶液）による硬組織成分の変性は最小限に低減され、その収量が飛

躍的に増大する。

更に、本発明の製造方法においては、上記の硬組織と酸又は／及び酵素との混合物の溶解を減圧下で行う以外に、これと同等の効果を生じる方法として、前記混合物を加圧下又は超音波の作用下で溶解させることができる。

これらの条件下で前記硬組織を溶解させる場合、前記硬組織と前記酸又は／及び前記酵素との混合物を雑菌の繁殖を防止する等の点から、0～30℃で溶解させることが好ましい。

また、上述したような条件下での反応によって、処理速度が向上すると共に、抽出成分の分子量の範囲域を大きくすることが十分に可能である。

ここで、上記した溶解処理によって、前記硬組織が完全に溶解されず、その溶解液中には残渣が存在することがある。本発明においては、前記生物硬組織を溶解する際に生じる残渣を前記酸又は／及び酵素で更に溶解処理することによって、一層十分に溶解物（前記画分）を得ることができる（図1参照）。

即ち、粉碎した硬組織と酸（又は／及び酵素）との混合物の溶解液を吸引濾過し、生じた残渣を更に溶解させることによって、その残渣からも硬組織の溶解物が得られ、これを上記混合物の溶解液と合わせると、高収率に目的物が得られるのである。この残渣の溶解処理でも上述の酸（例えばクエン酸）や酵素を使用することができる。また、ここでも上述したような溶解処理（例えば減圧溶解など）を適用してもよい。

また、硬組織の溶解過程で生じることのある前記残渣については、60～80℃の攪拌下で溶解するのが好ましい。

本発明に基づく硬組織溶解物（前記画分）は前記機能を有する食品

(特に機能性食品)のほか、医薬品、化粧品、骨充填剤(医療素材)、歯磨き素材、徐放性のある体内埋設ペレット、又は飼料等の主成分としても適用できる。

- 5 但し、食品として人間が経口摂取する場合には、人体に害毒がないことが必要である。この意味では、原材料となる骨成分に影響を与えず、しかも人体に害毒を与えない可溶化溶液として、乳酸、酢酸(米酢を含む。)、ワインヴィネガー、ギ酸等の有機酸は、特に好適である。

#### 産業上の利用可能性

- 10 本発明の抗酸化剤によれば、例えば、牛骨等の硬組織を可食酸又は果実から得られる酵素等で溶解して得られる物質であって、過酸化抑制機能、活性酸素(特に、 $O_2^-$ )消去能及びフリーラジカル(特に、 $\cdot OH$ )消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの機能を備えた画分を含んでいるので、前記各機能の優れた活性を有し、また、発癌等の安全性に問題が無く、かつ保存性や熱的安定性等にも優れた性能を発揮する抗酸化剤を提供できる。

- 15 20 また、本発明の製造方法によれば、例えば、牛骨等の硬組織を可食酸又は果実から得られる酵素等で溶解させて、過酸化抑制機能、活性酸素(特に、 $O_2^-$ )消去能及びフリーラジカル(特に、 $\cdot OH$ )消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの機能を備えた画分を得るので、前記各機能の優れた活性を有し、また、発癌等の安全性に問題が無く、かつ保存性や熱的安定性等にも優れた性能を発揮する抗酸化剤を効率よく製造することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は本発明に基づく可溶化骨成分の分画例を示すフロー図である。

図2はロダン鉄法による過酸化抑制能の評価結果を示すグラフである。



図 3 は T B A 法による過酸化抑制能の評価結果を示すグラフである。

図 4 は S D S ポリアクリルアミド電気泳動法によるフリーラジカル ( $\cdot OH$ ) の消去能の評価結果を示すグラフである。

5 図 5 は本発明に基づく凍結乾燥粉末状アパタイトカルシウムエキス (凍結乾燥 A C E) の濃度 (%) による活性酸素 ( $O_2^-$ ) の消去能の評価結果を示すグラフである。

図 6 は同、凍結乾燥粉末状アパタイトカルシウムエキス (凍結乾燥 A C E) の濃度 (%) によるフリーラジカル ( $\cdot OH$ ) の消去能の評価結果を示すグラフである。

10 図 7 は従来から使用されているスーパーオキシドディスムターゼ (S O D) の濃度 (%) による活性酸素 ( $O_2^-$ ) の消去能の評価結果を示すグラフである。

図 8 は同、ジメチルスルホキサイド (D M S O) の濃度 (%) によるフリーラジカル ( $\cdot OH$ ) の消去能の評価結果を示すグラフである。

15 図 9 は T B A 法による過酸化抑制能の評価結果を示す他のグラフである。

図 1 0 は T B A 法による過酸化抑制能の評価結果を示す他のグラフである。

20 図 1 1 はロダン鉄法による過酸化抑制能の評価結果を示す他のグラフである。

図 1 2 は肝臓中の過酸化脂質の量を示すグラフである。

図 1 3 は血液中の G P T 量を示すグラフである。

図 1 4 はアラミーゼの量を示すグラフである。

#### 実施例

以下、本発明を具体的な実施例について説明するが、本発明は以下の

実施例に限定されるものではない。

#### <TBE (Total Bone Extract) の作製>

まず、牛骨を平均粒径 5 mm 以下の粉末状に、発熱を極力抑えながら粉砕し、水でよく洗浄した。洗浄後、この粉体 (1000 g) を 10 %  
5 濃度の乳酸溶液 (9000 mL) と混合し、減圧状態 (15 Torr) にて放置した。

このような条件下でおよそ 5 ~ 6 時間放置すると、牛骨のミネラル成分や有機成分をほぼ完全に可溶化することができた。また、攪拌しながら溶解 (可溶化) を行った場合 2. 5 ~ 3 時間で可溶化することができた。但し、前述の溶解過程で生じた残渣は、クエン酸を使用して温度 6  
10 0 ~ 80 °C で攪拌しながら更に溶解し、これを前記溶解物に加えて可溶化 TBE とした。

次いで、可溶化した溶液を凍結、乾燥して凍結乾燥 TBE (FD-TBE) を得た。

#### 15 <TBE から可溶化画分の作製>

次に、図 1 にそのフローをすように、上述の方法で得られた凍結乾燥 TBE (可溶化骨成分) 10 g を 60 % エタノール溶液で抽出して可溶化画分 A (5. 76 g) と沈殿 A とを得た。

更に、沈殿 A を残渣とし、この残渣を水 (D. W. : 蒸留水) で抽出  
20 して可溶化画分 A (3. 98 g) と沈殿 B (0. 26 g) とを得た。

また、前記 FD-TBE を温度 80 °C で熱処理して熱処理 TBE を得た。

#### <過酸化抑制能試験>

##### (1) 試料の種別

前記手法で可溶化した骨成分 (TBE : Total Bone Extract) の過酸

化抑制能を確認した。

また、過酸化抑制能を有する画分の極性を調べるため、図1に示すように、凍結乾燥TBE (FD-TBE) を60%エタノールを用いて分画した。ここで使用した試料は、FD-TBE、可溶化画分A、可溶化画分B及び熱処理TBEである。具体的には、可溶化画分Aは、水にもエタノールにも溶解する画分であり、可溶化画分Bはエタノールには溶解せず水に溶解する画分である。

## (2) 過酸化抑制能の評価 (ロダン鉄法)

図2は、ロダン鉄法に基づく試験開始後15日までのリノール酸に対する過酸化抑制能の評価結果を示すものである。これは、波長500nmにおいての吸光度変化によるリノール酸の酸化進行度を示すものである。

ここでは、反応液の最終濃度が0.02%になるように調整した試料のエタノール溶液に、2.51%のリノール酸・エタノール溶液を2.0mL加えた後、4.0mLの0.05M (モル：以下、同様) リン酸緩衝液 (pH7.0) 及び2.0mLの蒸留水を加えて密封し、温度40℃で暗所に放置したものを使用した。また、比較として現在食品に使用されている合成抗酸化剤のBHT (ブチルヒドロキシトルエン：以下、同様)、BHA (ブチルヒドロキシアニール：以下、同様)、天然抗酸化剤の $\alpha$ -トコフェロールを本実施例と同一濃度にして測定した。

確認試験は、上記のように調製した各反応液0.1mLを試験管に入れ、75%エタノール9.7mL及び30%チオシアン酸アンモニウム0.1mLを加え、その後、3.6%塩酸に溶解させた $2 \times 10^{-2}$ M塩化第一鉄0.1mLを加えて反応させ、3分後に波長500nmの吸光度を測定した。

図 2 より、食品添加物として現在一般に使用されている天然抗酸化剤の $\alpha$ -トコフェロール（比較例）との過酸化抑制能の比較では、およそ 10 日目までは、FD-TBE、可溶化画分 A、可溶化画分 B 及び熱処理 TBE は、いずれも $\alpha$ -トコフェロールと同等かそれに優る過酸化抑制能を示した。また、10 日目以降では、可溶化画分 A が $\alpha$ -トコフェロールの過酸化抑制能を下回ったが、他の本実施例の試料では 15 日を経過するまで $\alpha$ -トコフェロールに優る過酸化抑制能を呈した。

また、ここで分かったことの一つに、従来の抗酸化剤（特に $\alpha$ -トコフェロール）が大気中に放置しておくとき著しく過酸化抑制能を喪失するのに比較して、本実施例の抗酸化剤である TBE（特に FD-TBE、可溶化画分 B 及び熱処理 TBE）は通常の大気中に放置しても、またそれが高温のままの放置であっても酸化抑制の能力上の問題を生じないという特異性があった。

この結果、本実施例（FD-TBE、可溶化画分 A、可溶化画分 B 及び熱処理 TBE）の抗酸化剤は、食品添加剤として使用する場合や医薬品、化粧品として使用する場合にも、取り扱いが非常に容易になると考えられる。

### （3）過酸化抑制能の評価（TBA法）

図 3 は、リノール酸の酸化が進んで生成されるマロンアルデヒドの相対量を測定する TBA 法（Thiobarbituric acid method）の評価結果を示すものである。

ここでは、反応液（上記と同様）2.0 mL を試験管に入れ 2.0 % トリクロロ酢酸 2.0 mL 及び 0.7 % チオバルビツール酸 1.0 mL を加え、沸騰水浴中に 10 分間浸漬し、冷却後、遠心分離（300 rpm  $\times$  10 min）し、所定期間をおいて波長 532 nm の吸光度を測定し

た。

図 3 によれば、7 日目経過時点において、FD-TBE、可溶化画分 A、可溶化画分 B 及び熱処理 TBE は、いずれも  $\alpha$ -トコフェロールと同等かそれ以上の過酸化抑制能を示している。また、16 日目経過時点  
5 をみると、可溶化画分 A がやや  $\alpha$ -トコフェロールに劣るものの、他の試料はすべて  $\alpha$ -トコフェロールよりも優れた過酸化抑制能を示しており、特に、FD-TBE、可溶化画分 B 及び熱処理 TBE は 7 日目経過時点とほぼ同じような値となっており、優れた過酸化抑制能を有していることが分かった。

10 また、特に、従来の天然系過酸化抑制剤 ( $\alpha$ -トコフェロール) は熱安定性が悪く、加熱後の酸化防止機能に難点があった。しかし、TBE (凍結乾燥 TBE) では、加熱処理によっても (即ち、熱処理 TBE) 比較的安定な過酸化抑制能が確認された。

<活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能の試験>

15 下記の表 1 は、本実施例の FD-TBE 及び合成抗酸化剤である BHA (比較例) の各種活性酸素種の消去能を測定したものの評価結果である。

20 スーパーオキシド ( $O_2^-$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の各活性酸素種発生系に対し、FD-TBE 又は BHA を添加したものと、無添加のものとを X-バンド ESR 装置を用いて、その消去率を測定したものである。FD-TBE は、それぞれの活性酸素に対して消去能が見られており、特に一重項酸素 ( $^1O_2$ ) については、非常に高い消去能が確認された。

表 1

	$O_2^-$	$\cdot OH$	$^1O_2$
FD-TBE	26	11.2	96
BHA	63	0	6

(但し、数値は消去剤無添加のものを100としたときの各種活性酸素種に対する消去率(%)である。)

- 10      ここで、体内の活性酸素及びフリーラジカルは、近時の医学的報告によれば、美容上の問題であるシミ・ソバカスや、老化や発癌その他の疾病全般に関与する可能性が非常に高いといわれているが、本実施例の抗酸化剤を摂取することにより、体内の活性酸素及びフリーラジカルをかなりの程度消去することが期待できる。即ち、本実施例の抗酸化剤は、
- 15      医薬品や化粧品に使用することは十分に可能であり、また、このような用途に対して有用であると考えられる。

#### <安全性の検討(ラット小核試験)>

- 合成抗酸化剤であるBHA及びBHTでは、発癌との因果関係が多く報告されている。下記の表2に、「飼料分析基準の制度について」(昭和62年2月24日付け61畜B第3815号、畜産局長通達)に記載
- 20      のラット小核試験に準じて実施した安全性試験の結果を示した。

ここでは、多染性血球を1個体につき1000個観察し、小核を保有する細胞数を数えた。その結果、小核出現頻度から、FD-TBE投与群(TBE-1~TBE-5)では対照群(cont-1~cont-4)と出現頻度に関し、9.9%(有意差 $p < 0.01$ )信頼区間で有意差が認め

られなかった。以上の結果から、FD-TBEには変異原性における安全上の問題は認められなかった。

表 2

5	基準飼料対照群		FD-TBE投与群	
		小核数		小核数
10	cont-1	1	TBE-1	0
	cont-2	0	TBE-2	1
	cont-3	2	TBE-3	1
	cont-4	0	TBE-4	0
			TBE-5	2

15 有意差検定  $P < 0.01$

<アパタイトカルシウムエクス (ACE) の評価>

次に、アパタイトカルシウムエクス (以下、ACEと称することがある。) について、その過酸化抑制能 (酸化抑制能) を評価した。このACEは前記可溶化TBEそのものである。

20 真皮の構成成分であるコラーゲンを皮膚老化の指標とし、アパタイトカルシウムエクスの抗老化・抗ラジカル作用を検討した。

第一に、過酸化水素・銅イオンの系で発生させたヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) は、コラーゲンを分断することを確認した。次いで、試験系にカタラーゼ (過酸化水素を分解する酵素) を加えたところ、コラーゲンの分解は抑制された。そこで、酵素カタラーゼをヒドロキシラジカル



消去能を有するポジティブ・コントロールとして、ACEとの酸化抑制能の比較を行った。

5      その結果、ACEのヒドロキシラジカル消去能は、ACE 0.5 mg/mL のとき、酵素カタラーゼ活性 70 units/mL より高いことが SDS ポリアクリルアミド電気泳動のパターンから、肉眼的に確認された。以下、この評価手順を簡単に説明する。

(1) サンプルとその調製

10      コラーゲン…子牛皮膚由来のペプシン消化コラーゲン (PC) を 1 mM 塩酸で希釈し、0.05% 溶液として使用した。コラーゲン濃度は、含有するヒドロキシプロリン量の測定結果から算定した。

カタラーゼ (牛肝臓製) …和光純薬社製・生化学用の凍結乾燥粉末を使用した。酸性条件下での酵素活性を所定の方法で測定し、2300 units/mg と算定した。以下、カタラーゼの酵素活性は、この値を基準に計算した。

15      その他の試料 (塩酸、塩化銅、過酸化水素等) はすべて和光純薬社製の特級を使用した。

(2) ACE の調製

20      ACE は、これを凍結、乾燥した凍結乾燥粉末状 ACE の 5% 水溶液を、外液の 1 mM 塩酸に対して透析 (10,000 cut off) し、塩を除去した後、凍結乾燥してその固体を得た。この凍結乾燥物は 4°C で保存し、試験の直前に蒸留水で 5 mg/mL に溶解して用いた。

以下の表 3 に、使用したサンプルの成分、組成を示す。

表 3

5

10

15

20

	コントロール	ネガティブ・コントロール	カタラーゼ 35units/ mL	カタラーゼ 70 units/mL	カタラーゼ 140 units/mL	A C E
0.05% コラーゲン	1000	1000	1000	1000	1000	1000
1mM 塩 酸	800	600	575	550	500	400
0.05mM 塩化銅	—	200	200	200	200	200
30% 過酸化 水素水	—	200	200	200	200	200
1.25 mg/mL カタラーゼ	200	—	25	50	100	—
5mg/mL A C E	—	—	—	—	—	200

### (3) 評価

次に、SDSポリアクリルアミド電気泳動法により、上記各サンプルのヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )の消去能を測定した。以下、簡単にその操作手順を示す。

- 5        まず、上記各サンプルを35℃でインキュベート(加熱、保温)し、0時間後(即ち、インキュベート直後)及び4時間後にサンプリングを行った。サンプル200 $\mu\text{L}$ に0.085M EDTAを加えた後、反応を停止した。

- 10       次に、サンプルとバッファーとを混和し、80℃で2分間反応させ、コラーゲンを変性させた。

次いで、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ の各コラーゲン鎖を分離後、クマシーブリリアントブルーで染色した。

図4に、前記SDSポリアクリルアミド電気泳動パターンを示す。

### (4) 結果

- 15       図4に示した各サンプルのバンドについて、順に説明する。

#### コントロール(0時間及び4時間)

- 実験に使用したコラーゲンとカタラーゼが、時間の経過と共に(ラジカルのためではなく)劣化して分解されてしまわないことを確認した。反応開始後、0時間(反応開始直後)と4時間で、コラーゲンのバンド  
20       には全く変化がなく、カタラーゼもわずかに分解されているだけである。従って、この実験系には発生させたヒドロキシラジカル以外に、コラーゲンを分解する要因は含まれていないと言える。

#### ラジカルのみ添加

上記のコントロールにヒドロキシラジカル発生系のみ(即ち、塩酸、塩化銅及び過酸化水素)を加えたサンプルである。ラジカルによる反応

開始後4時間経過したもののバンドであり、ラジカルによってコラーゲン分子は分解され、 $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ 鎖のバンドは薄くなっていることが分かる。

#### マーカー

- 5 Bio-Rad社製のPrestained SDS-PAGE Standards Broad Rangeをマーカーとして使用した。

#### カタラーゼ

- 10 コントロールのサンプルにヒドロキシラジカルとカタラーゼとを添加し、反応開始後4時間経過したもののバンドである。但し、カタラーゼは、ヒドロキシラジカルの発生を阻害し、コラーゲンの分解を防ぐポジティブ・コントロールである。また、数値は、反応系に加えたカタラーゼの量である。この結果、カタラーゼの濃度に比例して、コラーゲンの分解が抑制されていることが分かる。

#### ACE 0.5 mg/mL

- 15 コントロールのサンプルにラジカルとACEとを添加し、反応開始後4時間を経過したもののバンドである。特に、カタラーゼを35 units/mL及び70 units/mL添加したものよりも、コラーゲンは分解から保護されていることがそのバンドから確認できる。

#### マーカー

- 20 上記と同様のマーカーである。

#### ACEのみ

上記ACE 0.5 mg/mLに使用したものと当量のACEのみの場合のバンドである。即ち、ヒドロキシラジカルの発生系が含まれないものである。

以上の結果から、本実施例のACEは、従来より使用されている酵素

カタラーゼと同等又はそれ以上の過酸化抑制能を有していることが分かった。

次に、下記の表 4～5 に示した組成の凍結乾燥粉末状アパタイトカルシウムエキス（凍結乾燥 ACE）を用いて、ヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）及びスーパーオキシド（ $\text{O}_2^-$ ）に対する消去能を調べた。

図 5 は、凍結乾燥粉末状アパタイトカルシウムエキス（凍結乾燥 ACE）によるスーパーオキシド（ $\text{O}_2^-$ ）の消去能を示すグラフである。但し、縦軸は、凍結乾燥 ACE 無添加の場合の  $\text{O}_2^-$  の量を 1 としたときの相対量である。下記の表 4 に、この時使用した凍結乾燥 ACE を含むサンプルの組成を示す。但し、表中 EDTA とはエチレンジアミンテトラ酢酸、DMPO とは 5, 5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシドを示す（以下、同様）。

表 4

	組 成	リファレンス	最終サンプル
5	50mMリン酸緩衝液(pH 7.4)－ 0.1mM EDTA	120 $\mu$ L	120 $\mu$ L
10	1.25mMヒポキサンチン (hypoxanthine)	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L (125mM)
	8.8mM DMPO	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L (880mM)
15	凍結乾燥ACE	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
	H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ L	18 $\mu$ L
20	20U/mLキサンチンオキシダーゼ (xanthine oxdase)	—	2 $\mu$ L (0.2U/mL)
	合計	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L

同様に図 6 は、凍結乾燥ACEによるヒドロキシラジカル ( $\cdot$ OH) の消去能を示すグラフである。この時使用したサンプルの組成を下記の表 5 に示す。

表 5

	組 成	リファレンス	最終サンプル
5	50mMリン酸緩衝液(pH 7.4)－ 0.1mM EDTA	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
10	10M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L (1mM)
	凍結乾燥ACE	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
	8.8mM DMPO	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L (8.8mM)
15	H <sub>2</sub> O	40 $\mu$ L	20 $\mu$ L
20	0.1mM FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	—	20 $\mu$ L (0.01mM)
	合計	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L

ここで、表 4 及び表 5 において、リファレンスとは「コントロール」とほぼ同義語であり、評価の基準である。また、最終サンプルとは、最終的に試験に供したサンプル（試薬）の組成である。勿論、表 4 及び表



5 において、凍結乾燥ACEの濃度は図5及び図6に対応する値に適宜変動させたものを使用した。

次に、図7に比較例として、スーパーオキサイド ( $O_2^-$ ) に対する最も一般的な消去剤と考えられるスーパーオキサイドディスムターゼ (SOD) を用いてスーパーオキサイドの消去能を調べた。この時の溶液の組成は凍結乾燥ACEを使用したこと以外は表4に示したものと同様である。

同様に、図8に比較例としてヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) に対する最も一般的な消去剤と考えられるジメチルスルホキサイド (dimethyl sulfoxide: DMSO) を用いてヒドロキシラジカルの消去能を調べた。この時の溶液の組成は凍結乾燥ACEを使用したこと以外は表5に示したものと同様である。

図5より、凍結乾燥ACEはその濃度が大きくなるにつれて、スーパーオキサイド ( $O_2^-$ ) の消去能も向上していることが分かる。特に凍結乾燥ACEの濃度が0.25%以上であることが好ましいものと思われる。

また、図7に示した一般的な  $O_2^-$  の消去剤であるスーパーオキサイドディスムターゼ (SOD) に比べても、同等又はそれ以上の消去能を有していることが分かる。

更に、図6よりヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) に対しては、特に凍結乾燥ACEの濃度が0.01%以上であることがその消去能からみて好ましいものと思われる。

また、図8に示した一般的な  $\cdot OH$  消去剤であるDMSO (ジメチルスルホキシド) と比べても、優れた消去能を有していることが分かる。

更に、図7及び図8で示したように、一般的な消去剤は、それぞれ対

応する活性酸素種に対して優れた消去効果を示しているが、本実施例の凍結乾燥粉末状アパタイトカルシウムエキ스는、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) に対しても、また、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) に対しても優れた消去効果を有していることが分かる。更に、図 4 から、過酸化抑制能にも優れていることが分かる。

#### <コラーゲン性蛋白質の評価>

次に、前記可溶化 TBE より塩析法又は陽イオン交換カラムクロマトグラフィー法により抽出したコラーゲン性蛋白質の過酸化抑制能について評価した。

図 9 は、TBE より抽出したコラーゲン性蛋白質の、リノール酸に対する過酸化抑制能について、前述の TBA 法で測定した結果を示すものである。

反応溶液中の各成分の濃度は、前述の TBA 法で示した通りである。但し、コラーゲンそのもの及び TBE より抽出したコラーゲン性蛋白質は、TBE 中のコラーゲン濃度に相当する量を反応溶液に添加した。また、図 9 には、2 日後、7 日後、9 日後のマロンアルデヒドの生成量を縦軸に示した。

図 9 に示す通り、コラーゲンそのものにはリノール酸に対する過酸化抑制能がそれほど認められないが、TBE より抽出したコラーゲン性蛋白質は、ポジティブ・コントロールである  $\alpha$ -トコフェロールと同等以上の過酸化抑制能を有することが確認された。

#### <非コラーゲン性蛋白質の評価>

図 10 及び図 11 は、前記可溶化 TBE 中に含まれる非コラーゲン性蛋白質（以下、NCP と称することがある。）のリノール酸に対する過酸化抑制機能について、前述の TBA 法（図 11）及びロダン鉄法（図

10) を用いて測定した結果を示すものである。

5 非コラーゲン性タンパク成分は、可溶化TBE中より抽出した物を凍結乾燥して得られたものであり、これをNCPとして用いた。但し、NCPは、可溶化TBEからコラーゲン性蛋白質を抽出した際に生じた残渣をゲル濾過等のカラムクロマトグラフィーを行い調整して得られた非コラーゲン性蛋白質である。なお、反応溶液の調製方法は先に述べた通りであり、対象として用いた各種抗酸化物質（BHA、BHT及び $\alpha$ -トコフェロール）、可溶化TBE（透析済みTBE及び未透析TBE）、NCPは最終濃度が0.02%になるように調製した。

## 10 結果

図10及び図11により、評価開始17日後までの間で、TBE中の非コラーゲン性タンパク成分はリノール酸の酸化を抑制するということが確認された。また、その過酸化抑制機能は、最も一般的な酸化防止剤として食品などに添加される機会の多い $\alpha$ -トコフェロールと比較しても優れていることが確認された。

15 以上の結果より、原料となる生物硬組織を可食酸などと混合して溶解することによって得られる各画分は過酸化抑制機能を有するものであり、その活性は特に、コラーゲン性タンパク成分（ペプチド、ゼラチンなど）、非コラーゲン性タンパク成分などの有機成分に由来するものであると考えられる。

20 <可溶化骨成分（TBE）を食品として用いた場合の抗酸化活性の評価>

### 目的

ラットにラジカル発生剤（以下、AAPHと称することがある。）を投与することによって、人工的に体内で活性酸素を発現させ、そこにTBEを投与することによって、この活性酸素を消去されるか、つまり食

- 品としてTBEを摂取した際、体内で抗酸化活性を示すか確認を行った。ここでは、体内で最も活性酸素の影響を受ける肝臓の障害の程度の測定を行った。肝障害の指標として肝臓中の過酸化脂質量、血液中のグルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ（以下、GPTと称する。）、
- 5 アミラーゼの測定を行った。これらの値は高値であるほど肝障害を生じていることを示す。

### 評価

- 一晚絶食・絶水させた7週令のS. D. 系雄ラットを実験に用いた。
- 10 対照（コントロール）群：何も処置しないで飼育したもの（飼育条件、絶食等は他の群と同様に行った）。
- AAPH群：ラジカル開始剤（AAPH）0.2 mM/Kgを腹腔投与したもの。
- ビタミンE（V. E.）投与群：水溶性ビタミンE 1 mg/Kgを生理食塩水に溶解させ腹腔投与し、60分後にAAPH溶液0.2 mM/Kgを腹腔投与したもの。
- 15 TBE投与群：TBE 1 g/Kgを生理食塩水に溶解させ、経口投与し、60分後にAAPH溶液0.2 mM/Kgを腹腔投与したもの。
- 各群とも投与後は餌・水を自由に摂取させ、投与48時間後にネンブータル麻酔下で肝臓、血液の採取を行った（一晚絶食）。

### 20 結果

ラジカル開始剤AAPHを添加することによって、肝臓中の過酸化脂質、血液中のGPT、アミラーゼの値は対照群と比較して高値を示した（図12、図13、図14参照）。しかし、TBEを摂取することによって、体内でも抗酸化活性を示すビタミンE（V. E.）よりもこれらの障害を軽減させる傾向であった。

体内の活性酸素及びフリーラジカルは近年の報告によると、癌、動脈硬化、アルツハイマー病等の様々な疾患の原因となり得ることが報告されている。本実施例のTBEを摂取することにより活性酸素及びフリーラジカルの影響を軽減させることが期待される。天然由来の抗酸化剤の多くは、試験管内では抗酸化活性を示すが、胃液や腸液等によって形態が変化し、不活性型へと変化してしまうことがある。しかし、TBEは試験管内で確認されている活性が、体内でも持続していることが示された。

次に、本発明の抗酸化剤（特にFD-TBE）を用いて、経口摂取用の顆粒、ドリンク剤を作製した。下記の表6及び表7に、その成分構成例を示す。

表6（顆粒の構成内容）

原料名	添加量（重量％）
還元乳糖（ミルヘン）	43.0
TBE	35.0
焼成牛骨粉（N-CaP）	18.0
甘味料（エリスリトール）	3.5
香料	0.5

表 7 (ドリンク剤の構成内容)

原料名	添加量 (重量%)
T B E	5. 0
甘味料 (蜂蜜)	3. 0
甘味料 (ニューフラクト)	10. 0
甘味料 (キシロオリゴ糖)	0. 5
甘味料 (エリスリトール)	2. 0
香料	0. 6

## 請求の範囲

1. 硬組織を溶解して得られる物質であって、過酸化抑制機能、活性酸素消去能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた  
5 少なくとも1つの機能を備えた画分を含む抗酸化剤。
2. 前記画分が、生物硬組織と酸又は／及び酵素とを混合、溶解して得られたものである、請求の範囲の第1項に記載した抗酸化剤。
3. 前記画分が、前記生物硬組織を溶解する際に生じる残渣を更に前記酸又は／及び酵素と混合、溶解して得られたものを含む、  
10 請求の範囲の第2項に記載した抗酸化剤。
4. 前記生物硬組織が家畜骨からなる、請求の範囲の第2項に記載した抗酸化剤。
5. 前記画分が、前記生物硬組織と酸又は／及び酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分を更に溶媒で抽出したものである、  
15 請求の範囲の第2項に記載した抗酸化剤。
6. 前記画分が、前記生物硬組織と酸又は／及び酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分を更に溶媒で抽出した後の残渣を、更に水で抽出したものを含む、請求の範囲の第2項に記載した抗酸化剤。
7. 前記溶媒がエタノールである、請求の範囲の第5項又は  
20 第6項に記載した抗酸化剤。
8. 前記酸が可食性の酸であり、前記酵素が果実酵素である、請求の範囲の第2項に記載した抗酸化剤。
9. 前記酸が、乳酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、アスコルビン酸、酒石酸、リン酸、フマル酸、グルコン酸及びアジピン酸からなる群より選ばれた少なくとも1種の酸である、請求の範囲の第



8項に記載した抗酸化剤。

5 10. 前記酵素が、パイナップル、レモン、メロン、キウイ  
フルーツ、マンゴー、パパイヤ、イチジク及びナシからなる群より選ば  
れた少なくとも1種の果実から得られた酵素と、KIBINNと、ポリ  
アーゼSMとからなる群より選ばれた少なくとも1種である、請求の範  
囲の第8項に記載した抗酸化剤。

11. 前記画分に少なくともコラーゲン性蛋白質が含有され  
ている、請求の範囲の第2項に記載した抗酸化剤。

10 12. 前記画分に少なくとも非コラーゲン性蛋白質が含有さ  
れている、請求の範囲の第2項に記載した抗酸化剤。

13. 前記画分が粉末状である、請求の範囲の第2項に記載  
した抗酸化剤。

14. 前記画分が熱処理されたものである、請求の範囲の第  
2項に記載した抗酸化剤。

15 15. 食品、医薬品、化粧品、医療用の骨充填剤、歯磨き素  
材、体内埋設用ペレット又は飼料に使用される、請求の範囲の第1項に  
記載した抗酸化剤。

20 16. 硬組織を溶解させて、過酸化抑制機能、活性酸素消去  
能及びフリーラジカル消去能からなる群より選ばれた少なくとも1つの  
機能を備えた画分を含む抗酸化剤を得る、抗酸化剤の製造方法。

17. 生物硬組織と酸又は／及び酵素とを混合する工程と、  
この混合物を溶解させる工程とを有する、請求の範囲の第16項に記載  
した製造方法。

18. 前記生物硬組織を溶解する際に生じる残渣を更に前記  
酸又は／及び酵素と混合、溶解して得られたものを前記画分に添加する、

請求の範囲の第 17 項に記載した製造方法。

19. 前記硬組織と前記酸又は／及び前記酵素との混合物を減圧下で溶解させる、請求の範囲の第 17 項に記載した製造方法。

5 20. 減圧状態から大気圧に少なくとも 1 回戻す、請求の範囲の第 19 項に記載した製造方法。

21. 前記硬組織と前記酸又は／及び前記酵素との混合物を加圧下で溶解させる、請求の範囲の第 17 項に記載した製造方法。

10 22. 前記硬組織と前記酸又は／及び前記酵素との混合物を超音波の作用下で溶解させる、請求の範囲の第 17 項に記載した製造方法。

23. 前記硬組織と前記酸又は／及び前記酵素との混合物を 0～30℃で溶解させる、請求の範囲の第 16 項～第 22 項のいずれか 1 項に記載した製造方法。

15 24. 粉砕した前記生物硬組織と可食性の酸又は／及び果実酵素とを混合する、請求項の範囲の第 17 項に記載した製造方法。

25. 前記酸として、乳酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、アスコルビン酸、酒石酸、リン酸、フマル酸、グルコン酸及びアジピン酸からなる群より選ばれた少なくとも 1 種の酸を使用する、請求の範囲の第 24 項に記載した製造方法。

20 26. 前記酵素として、パイナップル、レモン、メロン、キウイフルーツ、マンゴー、パパイヤ、イチジク及びナシからなる群より選ばれた少なくとも 1 種の果実から得られた酵素と、KIBINN と、ポリアーゼ SM とからなる群より選ばれた少なくとも 1 種の酵素を使用する、請求の範囲の第 24 項に記載した製造方法。

27. 前記生物硬組織を家畜骨とする、請求の範囲の第 17

項に記載した製造方法。

28. 前記生物硬組織と前記酸又は／及び前記酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分を溶媒で抽出して前記画分を得る、請求の範囲の第16項に記載した製造方法。

5 29. 前記生物硬組織と前記酸又は／及び前記酵素とを混合、溶解して得られた第1の画分を溶媒で抽出した後の残渣を、更に水で抽出して前記画分を得る、請求の範囲の第28項に記載した製造方法。

30. 前記溶媒をエタノールとする、請求の範囲の第28項又は第29項に記載した製造方法。

10 31. 前記画分に少なくともコラーゲン性蛋白質が含有される、請求の範囲の第17項に記載した製造方法。

32. 前記画分に少なくとも非コラーゲン性蛋白質が含有される、請求の範囲の第17項に記載した製造方法。

15 33. 前記画分を粉末状に粉碎する、請求の範囲の第17項に記載した製造方法。

34. 前記画分を熱処理する、請求の範囲の第17項に記載した製造方法。

20 35. 食品、医薬品、化粧品、医療用の骨充填剤、歯磨き素材、体内埋設用ペレット又は飼料に使用する前記抗酸化剤を得る、請求の範囲の第16項に記載した製造方法。

図 1

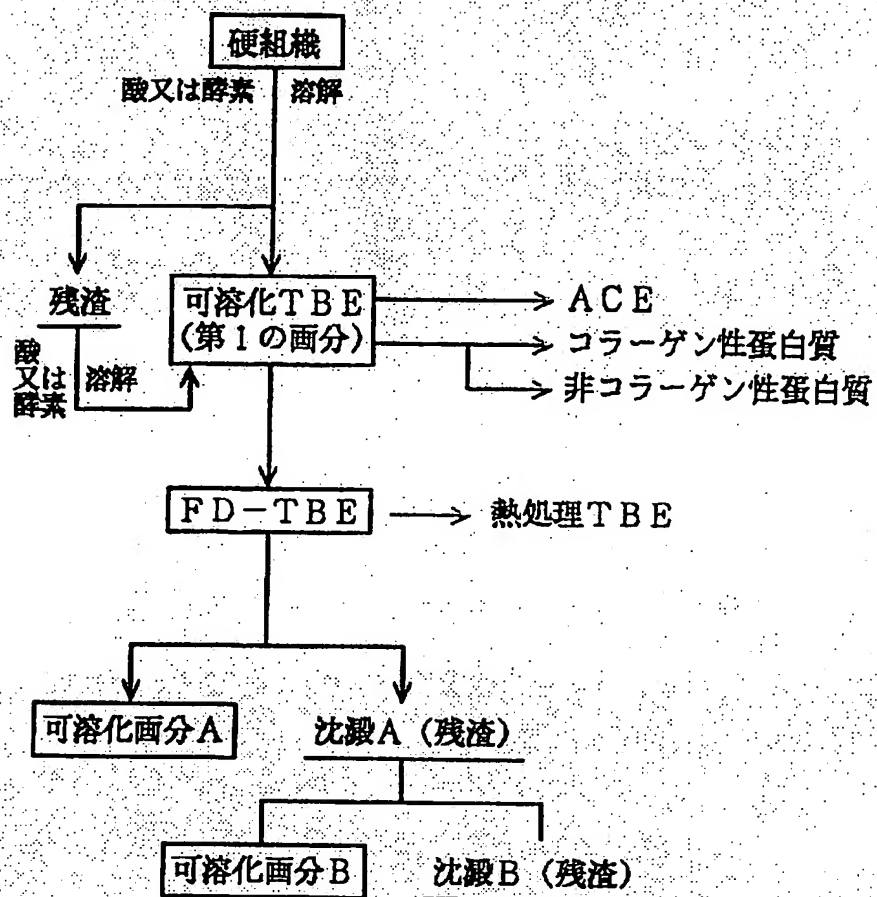
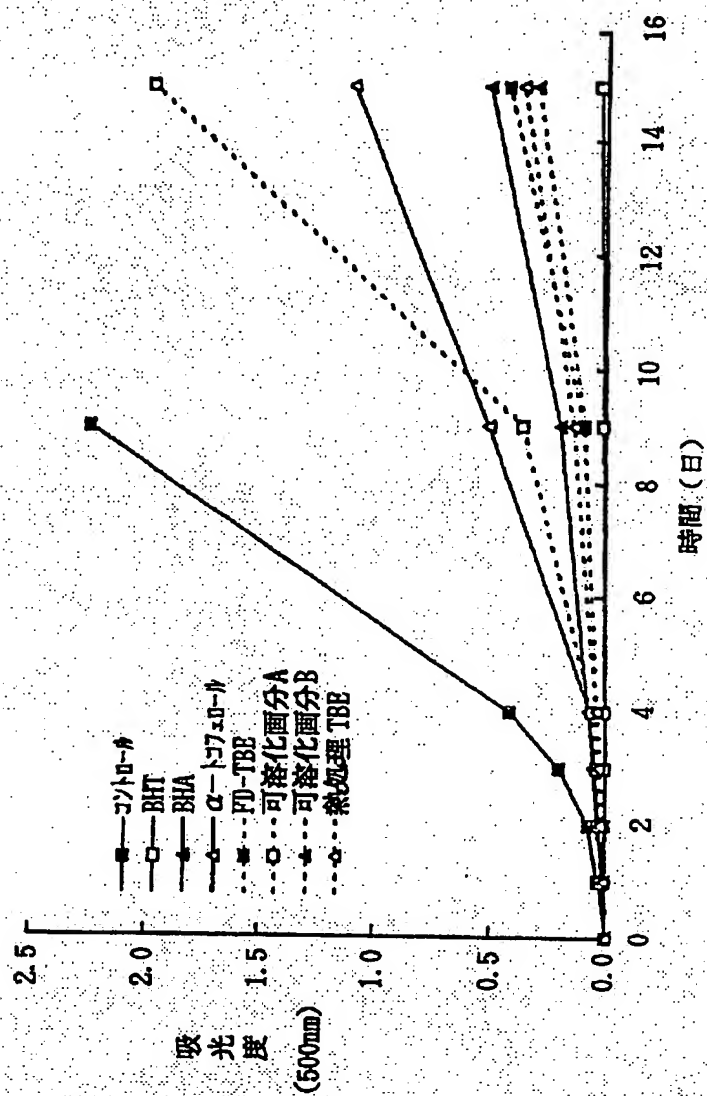
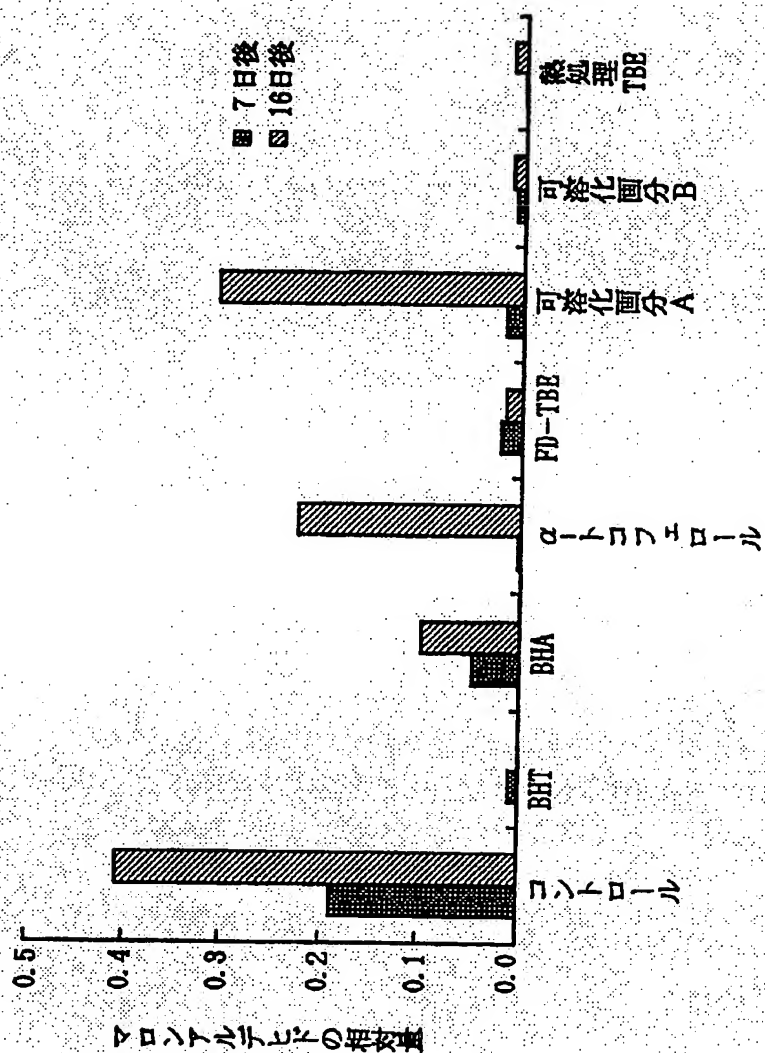


図 2



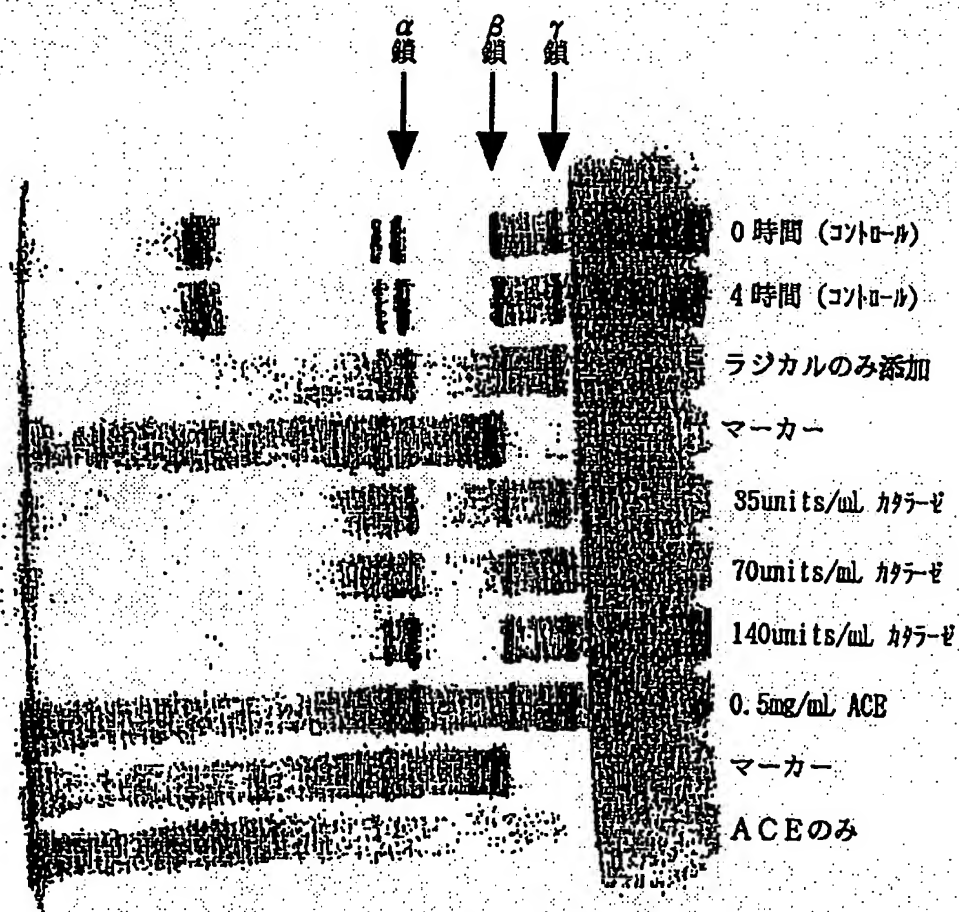
ロタン鉄法による過酸化抑制能

図 3



TBA法による過酸化抑制能

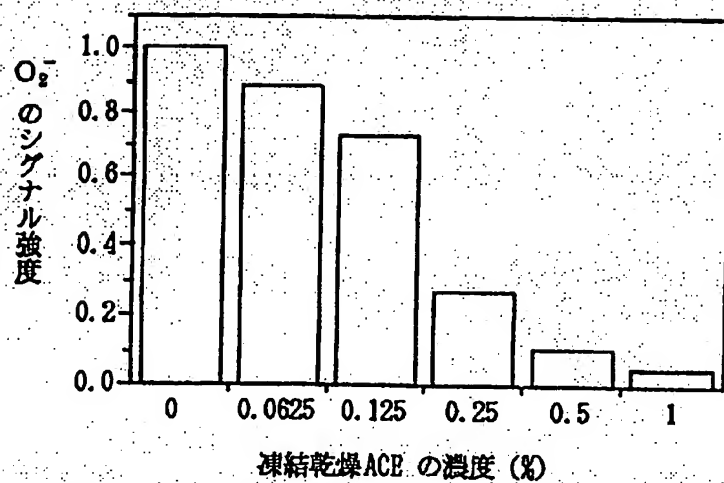
図 4



SDSポリアクリルアミド電気泳動法による

「・OH」の消去能

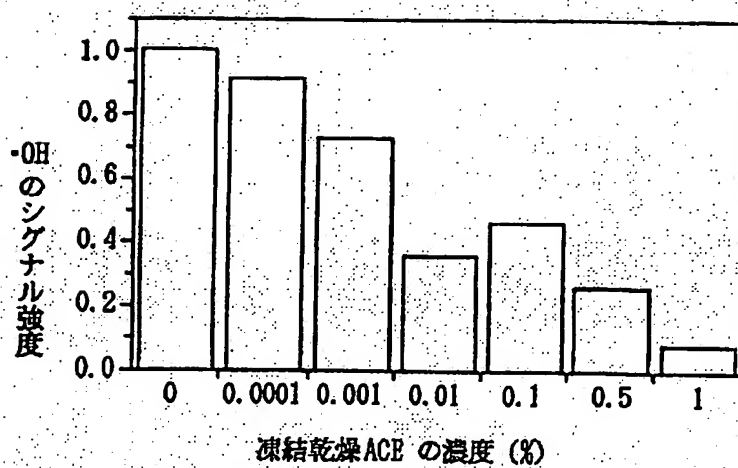
図 5



凍結乾燥粉末状アパタイトカルシウムエキス  
による「O<sub>2</sub><sup>-</sup>」の消去能（実施例）

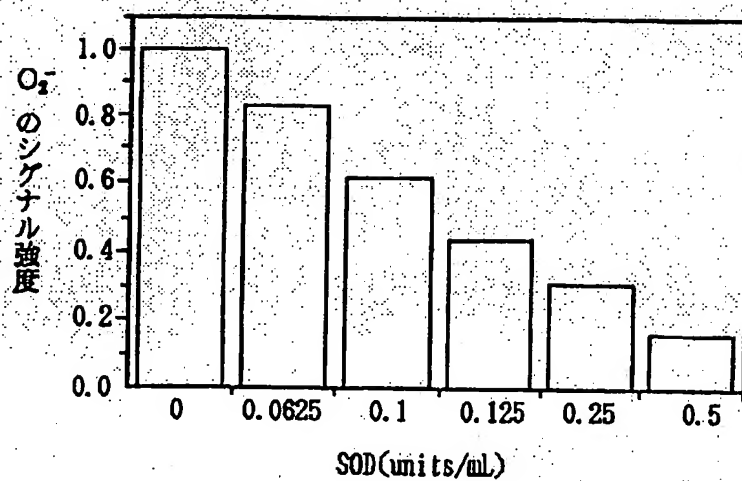


図 6



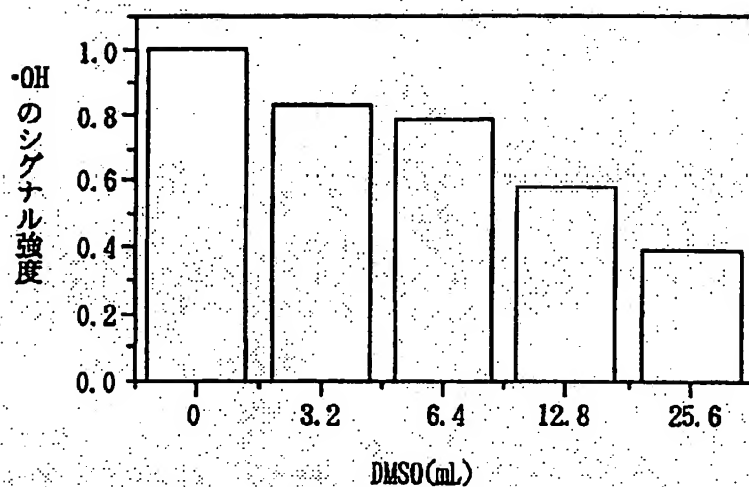
凍結乾燥粉末状アパタイトカルシウムエキス  
による「 $\cdot\text{OH}$ 」の消去能 (実施例)

図 7



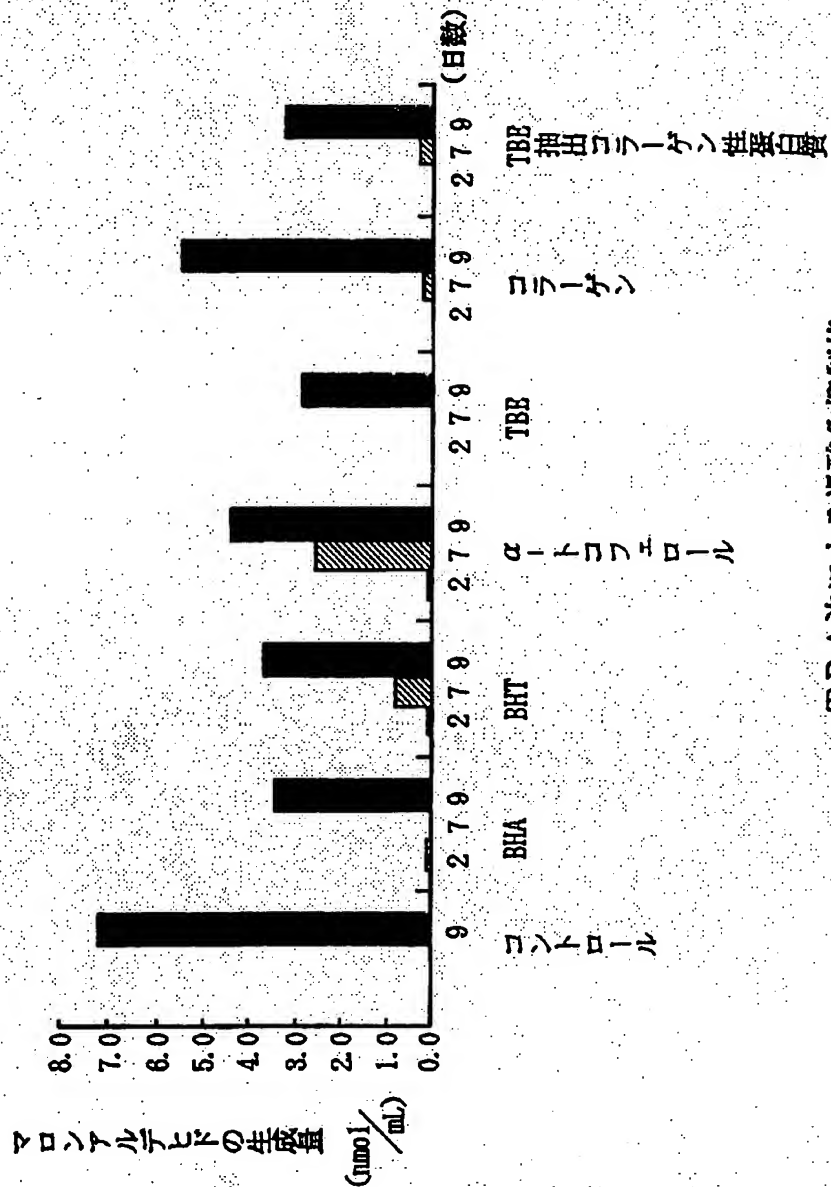
スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)  
による「O<sub>2</sub><sup>-</sup>」の消去能(比較例)

図 8



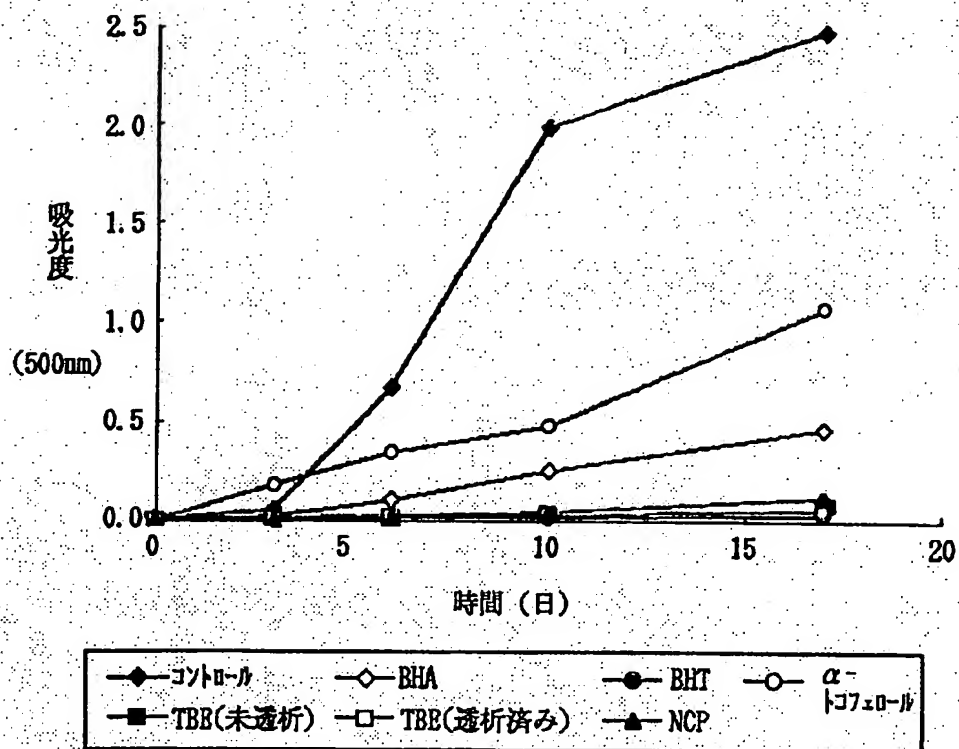
ジメチルスルホキサイド(DMSO)による  
「 $\cdot\text{OH}$ 」の消去能(比較例)

図 9



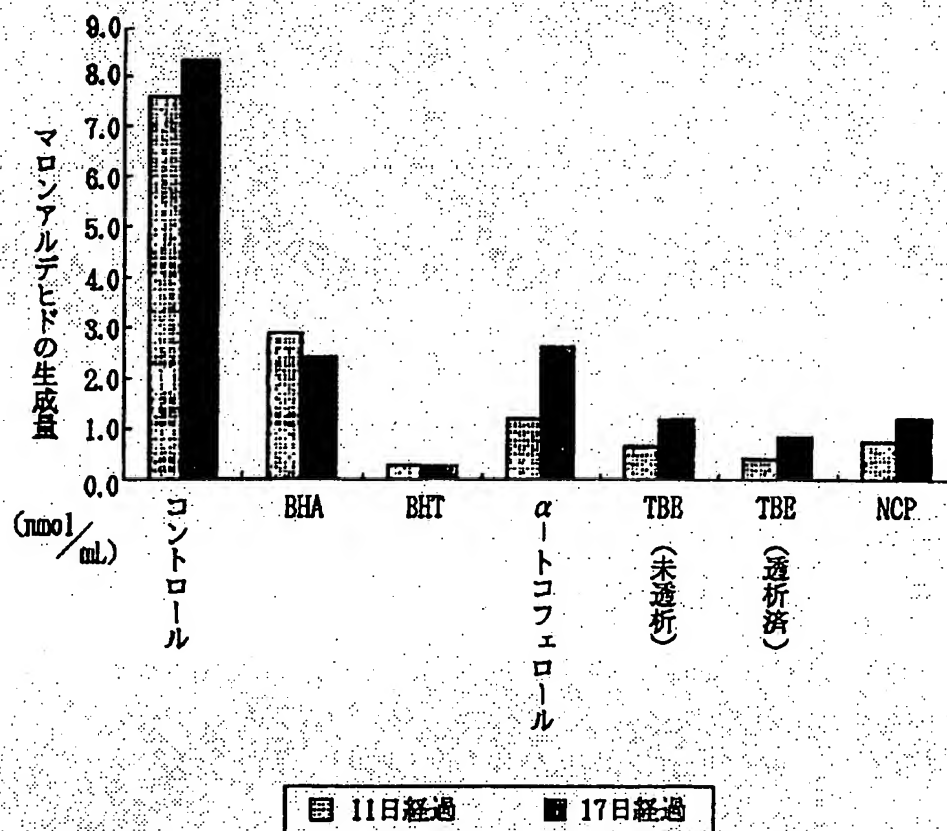
TBA法による過酸化抑制能

図 10



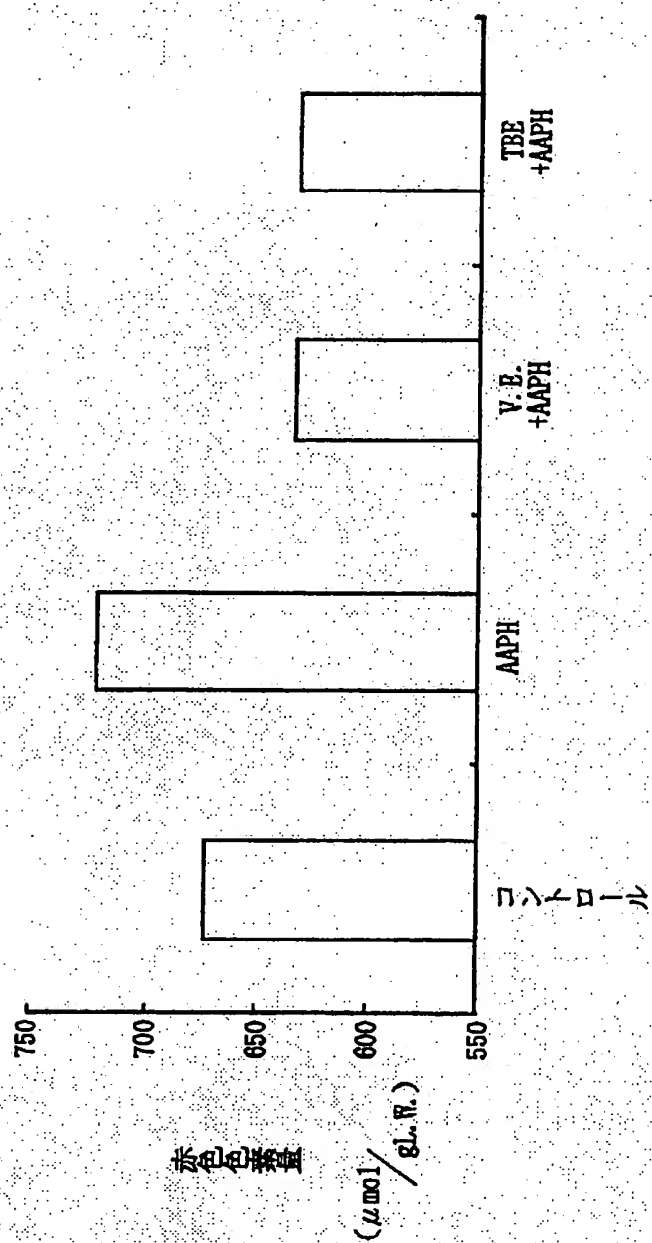
未透析TBE、透析済みTBE及び非コラーゲン性蛋白質 (NCP) の  
抗酸化活性 (ロダン鉄法)

図 1 1



未透析TBE、透析済みTBE及び非コラーゲン性蛋白質 (NCP) の  
抗酸化活性 (TBA法)

図 12



肝臓中の過酸化脂質量

図 13

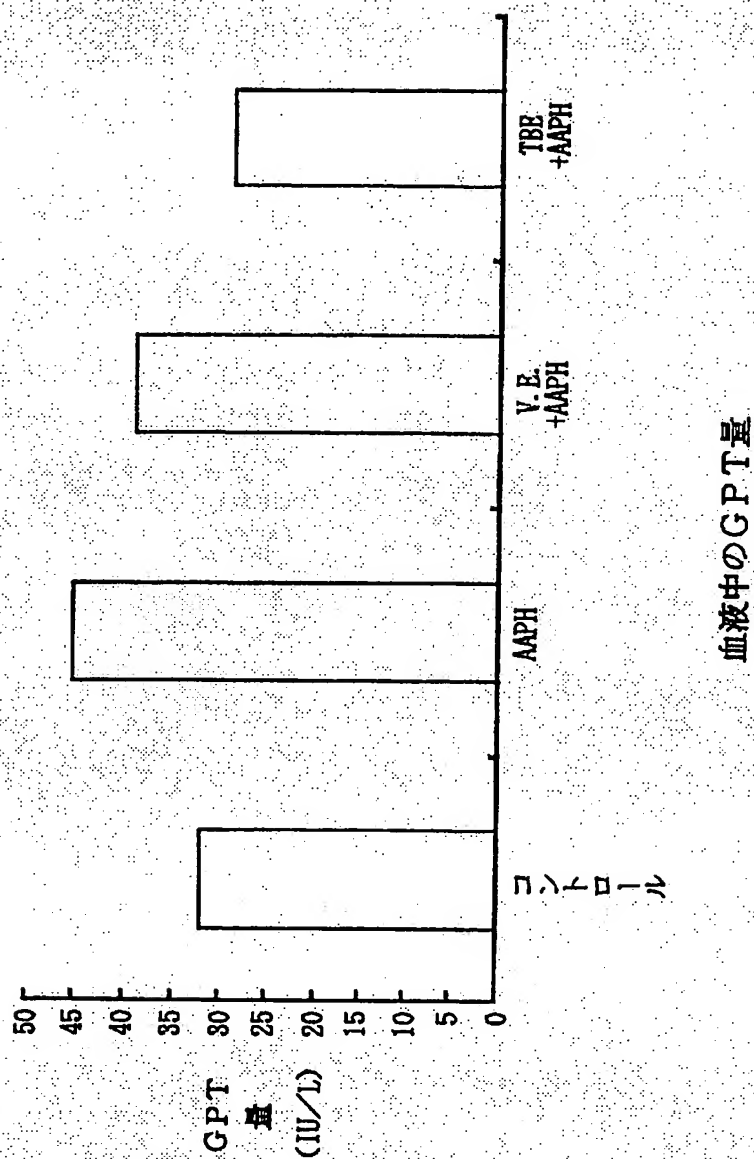
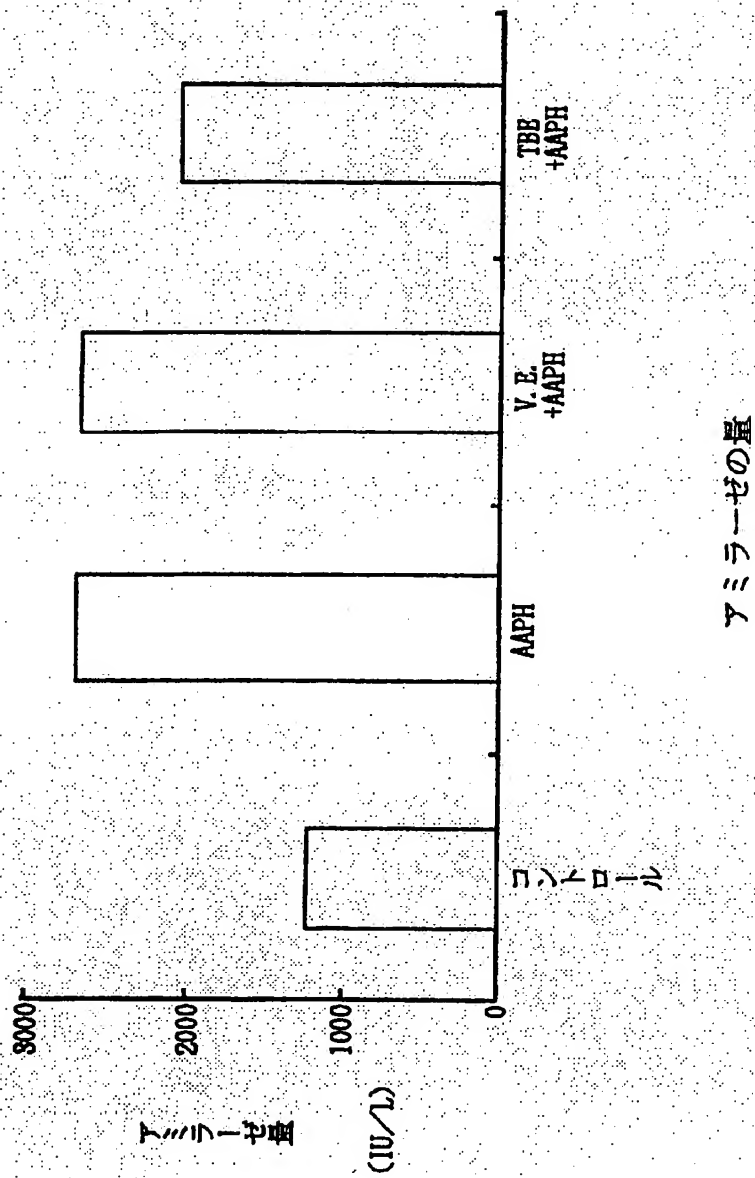




図 1 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00300

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C09K15/34, A23L1/30, A23L3/3472, A61K7/00, A61K7/16, A61K35/32, A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C09K15/34, A23L1/30, A23L3/3472, A61K7/00, A61K7/16, A61K35/32, A61K35/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 4-36214, A (Mikimoto Seiyaku K.K.), February 6, 1992 (06. 02. 92) (Family: none)	1 - 35
A	JP, 3-273098, A (Biotech Japan K.K.), December 4, 1991 (04. 12. 91) (Family: none)	1 - 35
A	JP, 3-217484, A (Mikimoto Seiyaku K.K.), September 25, 1991 (25. 09. 91) (Family: none)	1 - 35

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 6, 1997 (06. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

May 20, 1997 (20. 05. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/00300

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl. : C09K15/34, A23L1/30, A23L3/3472, A61K7/00, A61K7/16, A61K35/32, A61K35/78		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl. : C09K15/34, A23L1/30, A23L3/3472, A61K7/00, A61K7/16, A61K35/32, A61K35/78		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 4-36214, A (御木本製薬株式会社) 6.2月, 1992(06.02.92) (ファミリーなし)	1~35
A	JP, 3-273098, A (バイオテックジャパン株式会社) 4.12月, 1991(04.12.91) (ファミリーなし)	1~35
A	JP, 3-217484, A (御木本製薬株式会社) 25.9月, 1991(25.09.91) (ファミリーなし)	1~35
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	06.05.97	国際調査報告の発送日 20.05.97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本 堂 裕 司 印	4 H   9 0 4 9
電話番号 03-3581-1101 内線 3443		